

この酸化耐性 VCP を発現させるトランスジェニックマウスを作成しており、種々の神経変性疾患のモデルマウスと掛け合わせ実験を行うことで、神経変性疾患における Cys522 の酸化の意義を解明したいと考えている。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Maeda, H., Hori, S., Ohizumi, H., Segawa, T., Kakehi, Y., Ogawa, O., & Kakizuka, A. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of Arsenic Trioxide and L-Buthionine-Sulfoximine. *Cell Death Differ.* 7:737-746, 2004.
- 2) Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, H., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., Nakayama, K.I. Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J.* 23:659-669, 2004.
- 3) Sato, A., Imaizumi, M., Hoshi, Y., Rikiishi, T., Fujii, K., Kizaki, M., Kagechika, H., Kakizuka, A., Hayashi, Y., Inuma K. Alteration in the cellular response to retinoic acid of a human acute promyelocytic leukemia cell line, UF-1, carrying a patient-derived mutant PML-RAR_α chimeric gene. *Leukemia Res.* 9:959-967, 2004.
- 4) Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., & Fujita, T. The role of pre-existing aggregates in Hsp104-dependent polyglutamine aggregate formation and epigenetic change of yeast prions. *Genes Cells* 8:685-696, 2004.
- 5) Goti, D., Katzen S.M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haiem, L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kakizuka, A., Sharp, A. H., Ross, C. A., Mouton, P. R., & Colmer V. A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brain of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic

above a critical concentration. *J. Neuroscience* 24:10266-10279, 2004.

- 6) Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., Sobue, G. Physical and functional interaction between dorfins and valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitinated inclusions in neurodegenerative disorders. *J. Biol. Chem.* 279:51376-852004, 2004.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

ポリグルタミン病に対する治療法確立をめざして

分担研究者 永井義隆 大阪大学大学院医学系研究科ゲノム機能 助手

共同研究者 ポピエル明子¹⁾、藤掛伸宏¹⁾、小野寺 理²⁾、乾 隆³⁾、戸田達史¹⁾

¹⁾大阪大学大学院医学系研究科ゲノム機能、²⁾新潟大学脳研リソース研究センター、³⁾三重短期大学栄養学

研究要旨：ポリグルタミン（PolyQ）病は種々の脊髄小脳変性症、ハンチントン病などを含む一群の神経変性疾患の総称で、異常伸長 PolyQ 鎖が病的コンフォメーション変移を生じ、難溶性凝集体の形成あるいは病的な蛋白質間相互作用などを獲得し神経変性を引き起こすと考えられている。我々はこれまでに異常伸長 PolyQ 鎖選択的結合ペプチド QBP1 が *in vitro*、培養細胞およびショウジョウバエモデルにおいて異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集体形成・神経変性を抑制することを明らかにした。本研究では異常伸長 PolyQ 蛋白質の細胞毒性発揮機構を解明することと PolyQ 凝集阻害化合物を同定することを目的とした。PolyQ 鎖に Pro 残基を挿入して二次構造を破壊したところ、Pro 数依存的に凝集体形成・細胞毒性が減少したことから細胞毒性に対する PolyQ 鎖二次構造の重要性を示した。さらに可溶性βシート中間体およびアミロイド線維様凝集体の細胞毒性を示し、異常伸長 PolyQ 蛋白質はβシートへの病的コンフォメーション変移を経て細胞毒性を獲得することを明らかにした。一方、大規模な低分子化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングを行ない、66 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定した。本研究が有効な治療法の乏しい PolyQ 病に対する治療法開発へ向けた突破口となることが期待される。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症は小脳の進行性変性を主病変とし、運動失調と様々な神経症状を呈する神経変性疾患の総称で、現時点で有効な治療法の乏しい神経難病である。これらの疾患の原因は長らく不明であったが、遺伝性脊髄小脳変性症の大部分については原因遺伝子異常が明らかにされた。その多く（脊髄小脳失調症 1、2、3、6、7、17 型）はそれぞれ異なる原因遺伝子内にグルタミンをコードする CAG 反復配列の異常伸長という共通の遺伝子異常を持ち、同様の遺伝子異常を持つ球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症と併せてポリグルタミン（PolyQ）病と総称されている。

PolyQ 病の共通の発症分子機構として異常遺伝子から翻訳される異常伸長 PolyQ 鎖自身がβシートへの病的コンフォメーション変移を生じ、難溶性の凝集体を形成あるいは病的蛋白質間相互作用を獲得して神経変性を引き起こすと考えられている。我々はこれらの難治性疾患の治療法開発という視点から、これまでの研究で異常伸長 PolyQ 鎖選択的結合ペプチド QBP1 (Polyglutamine

Binding Peptide 1)を同定し、QBP1 が *in vitro*、培養細胞およびショウジョウバエモデルにおいて異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集体形成を阻害し、神経変性を抑制することを明らかにしてきた(*J. Biol. Chem.* 275: 10437, 2000, *Hum. Mol. Genet.* 12: 1253, 2003)。

本研究ではこれらの難治性疾患に対する治療法確立をめざして、①異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造変移と細胞毒性との関連を解明し、細胞毒性を発揮する構造異性体を特定して治療標的を明らかにすることと、②治療法確立へ向けたもう一つのアプローチとして、生体への投与がより容易な低分子化合物で QBP1 と同様の PolyQ 凝集阻害活性を持つものをハイスループットスクリーニングにより同定することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 細胞毒性を発揮する異常伸長 PolyQ 蛋白質構造異性体の特定

まず PolyQ 鎖の高次構造と凝集体形成・細胞毒性の関連を明らかにするために、PolyQ 鎖にプロ

リン残基 (Pro) を挿入することにより二次構造を破壊して凝集体形成・細胞毒性への影響を検討した。PCR 変異導入法により PolyQ 鎖に様々な数の Pro が挿入された QPQ 鎖を作製した。in vitro での実験では Thioredoxin-PolyQ/QPQ (Thio-PolyQ/QPQ) 融合蛋白質を大腸菌で発現・精製して用いた。二次構造については円偏光二色性分散 (CD) にて、凝集体形成については濁度測定法にて評価した。また COS-7 細胞に PolyQ/QPQ-GFP を発現させて、蛍光顕微鏡にて封入体形成・細胞死を評価した。さらに細胞毒性を発揮する PolyQ 蛋白質構造異性体を特定するために、Thio-Q62 の α ヘリックス優位なモノマー、 β シート変移した可溶性中間体およびアミロイド線維様凝集体をマイクロインジェクションにより COS-7 細胞内に導入して、細胞毒性を評価した。

(2) PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニング

Thio-Q62 凝集体形成の濁度測定法を用いて、24,000 個の化合物からなる大規模な低分子化合物ライブラリーから PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニングを行った。すなわち Thio-Q62 蛋白質 (8 μ M) と候補化合物 (10-20 μ M) を自動分注ロボットにて 384 プレートに分注して 37°C でインキュベーションし、プレートリーダーにて経時的に濁度を測定し凝集体形成を評価した。その結果、有意な凝集阻害活性を示す化合物を選択した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトを直接対象とした研究および動物実験は行っておらず、特記すべきことはない。

C. 研究結果

(1) 細胞毒性を発揮する異常伸長 PolyQ 蛋白質構造異性体の特定

CD 測定の結果、Thio-QPQ では Pro 数依存的に二次構造が破壊され、ランダムコイル優位な CD スペクトルを示した。また Thio-QPQ の凝集体形成も挿入 Pro 数依存的に遅延し、5 個の Pro を持つ Thio-Q55P5 では明らかな凝集体形成を認めなかった。COS-7 細胞での QPQ-GFP 発現実験ではやはり Pro 数依存的に封入体形成・細胞毒性は減少し、Q55P5-GFP では有意な封入体形成・細胞死を認めなかった。また、COS-7 細胞への Thio-Q62 構造異性体のマイクロインジェクション実験

では、 α ヘリックス優位なモノマーでは 3 日後の細胞生存率がコントロールの Thio-Q19 (77.1 %) とほぼ同程度の 75.1 %であったが、 β シートでは 38.1 %、凝集体では 41.0 %といずれも有意な細胞毒性を示した。

(2) PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニング

低分子化合物ライブラリー (24,000 個) のハイスループットスクリーニングの結果、大部分 (99.35 %) の化合物は Thio-Q62 凝集体形成に明らかな影響を認めなかったが、66 種類 (0.28 %) の新規の PolyQ 凝集阻害化合物を同定した。その中の 12 種類の化合物は非常に強力な PolyQ 凝集阻害活性を示した。また別の 80 種類以上 (0.37 %) の化合物では Thio-Q62 凝集の軽度遅延を認めた。

D. 考察

本研究では現時点で有効な治療法の乏しい PolyQ 病に対する治療法開発をめざして、細胞毒性を発揮する PolyQ 蛋白質の構造異性体を特定して治療標的を明らかにすることを試みた。PolyQ 鎖に Pro 残基を挿入して二次構造を破壊したところ、Pro 数依存的に凝集体形成・細胞毒性が減少したことから細胞毒性に対する PolyQ 鎖二次構造の重要性を示した。また異常伸長 PolyQ 蛋白質の様々な構造異性体をマイクロインジェクションにより培養細胞に導入したところ、可溶性 β シート中間体およびアミロイド線維様凝集体が有意な細胞毒性を示したことから、異常伸長 PolyQ 蛋白質は β シートへの病的コンフォメーション変移を生じることで細胞毒性を獲得すると結論した。昨年度に QBP1 の PolyQ 神経変性抑制の作用点として、異常伸長 PolyQ 蛋白質の β シートへのコンフォメーション変移を阻害することを報告したが、この結果と合致している。すなわち、PolyQ 病の治療標的としては異常伸長 PolyQ 蛋白質の β シートへの病的コンフォメーション変移を阻害することが重要であると考えられる。

一方、PolyQ 病治療法確立へ向けて、PolyQ 凝集阻害活性を持つ低分子化合物のハイスループットスクリーニングを昨年度より開始している。今年度は大規模な低分子化合物ライブラリー (24,000 個) のスクリーニングを行ない、66 種類の新規の PolyQ 凝集阻害化合物と 80 種類以上の凝集遅延化合物を同定した。今後、これらの化合物が治療標

的である異常伸長 PolyQ 蛋白質のβシートへの病的コンフォメーション変移を阻害することを確認し、培養細胞モデル、さらには PolyQ 病モデルシヨウジョウバエを用いて、*in vivo* での神経変性抑制効果を明らかにしたいと考えている。

E. 結論

- (1) PolyQ 鎖への Pro 残基挿入により凝集体形成・細胞毒性が減少したことから、細胞毒性に対して PolyQ 鎖二次構造が重要である。
- (2) 異常伸長 PolyQ 蛋白質はβシートへの病的コンフォメーション変移を生じることで細胞毒性を獲得する。
- (3) 低分子化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングにより同定した PolyQ 凝集阻害化合物は、PolyQ 病治療薬のリード化合物となる可能性がある。
- (4) 本研究は現時点で有効な治療法のない PolyQ 病に対して、治療法開発へ向けた基礎を確立するものである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) H.A. Popiel, Y. Nagai (equally contributed), O. Onodera, T. Inui, N. Fujikake, Y. Urade, W.J. Strittmatter, J.R. Burke, A. Ichikawa, T. Toda
Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 317, 1200-1206 (2004)

2) S. Kariya, M. Hirano, Y. Nagai, Y. Furiya, N. Fujikake, T. Toda, S. Ueno

Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches.

J. Mol. Neurosci. (in press)

3) 戸田達史、永井義隆

難治性神経疾患

Molecular Medicine 41, 314-321 (2004)

2. 学会発表

1) Y. Nagai, T. Inui, H.A. Popiel, N. Fujikake, K. Hasegawa, Y. Goto, H. Naiki, T. Toda

The peptide inhibitor QBP1 inhibits the toxic

conformational transition of the polyglutamine protein and amyloid-like fibril formation.

2004 FASEB Summer Research Conference: Protein misfolding, amyloid and conformational disease (June, 2004, Snowmass Village, Colorado)

2) Y. Nagai, H.A. Popiel, N. Fujikake, H. Matsushima, T. Toda

A turbidimetric high-throughput screening assay for small chemicals that inhibit polyglutamine aggregation *in vitro*.

The Hereditary Disease Foundation Meeting HD2004 (Aug, 2004, Cambridge, MA, USA)

3) Y. Nagai

A molecular therapy for the polyglutamine diseases using the peptide inhibitor QBP1.

Massachusetts General Hospital Neuroscience seminar (August 16, 2004, Cambridge, MA, USA)

4) Y. Nagai

Molecular pathogenesis and therapeutic targets of the polyglutamine diseases.

1st Italian-Japanese Workshop on Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies (December, 2004, Pavia, Italy)

5) 永井義隆、ポピエルヘレナ明子、藤掛伸宏、戸田達史

膜透過性阻害ペプチド PTD-QBP1 によるポリグルタミン病マウスの分子治療

第45回日本神経学会総会 (H16. 5、東京)

6) 永井義隆、ポピエルヘレナ明子、藤掛伸宏、乾隆、内木宏延、戸田達史

ポリグルタミン蛋白質の構造異常・凝集体形成を標的とするポリグルタミン病の治療戦略

第47回日本神経化学会 (H16. 9、大阪)

7) 永井義隆、ポピエルヘレナ明子、藤掛伸宏、山口政光、乾隆、内木宏延、戸田達史

阻害ペプチド QBP1 によるポリグルタミン病に対する分子治療法の確立

第49回日本人類遺伝学会 (H16. 10、東京)

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

多系統萎縮症モデルマウスの遺伝子発現解析

研究協力者 貫名 信行¹⁾

小山文隆¹⁾, 岩田淳^{1,2)}, 丸山美枝子¹⁾, 黒沢大¹⁾, 宮崎晴子¹⁾, 長岡詩子¹⁾

- 1) 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 構造神経病理研究チーム
- 2) 東京大学医学部神経内科

研究要旨 ヒト α -シヌクレインをマウスオリゴデンドロサイトに発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスのオリゴデンドロサイトではヒト α -シヌクレインの発現が認められ、その細胞体内には異常構造物が認められた。蓄積した α -シヌクレインはリン酸化 α -シヌクレイン抗体に反応し界面活性剤に不溶であった。老齡トランスジェニックマウスでは歩幅の減少、探索行動の消失などの運動障害が認められた。DNAチップを用いて8週齡、88週齡における小脳脳幹の遺伝子プロファイルを解析したところそれぞれ10種類、16種類の遺伝子の発現変化が示唆された。TaqMan RT-PCRで、melanoma antigen 遺伝子の発現の増加が8週齡のトランスジェニックマウスで確認できた。

A. 研究目的

多系統萎縮症 (MSA) は、孤発性疾患のため分子遺伝学的アプローチが困難であったが、MSAに特異的な glial cytoplasmic inclusion (GCI) の構成成分が野生型 α -シヌクレインであることが発見され、 α -シヌクレインが病態解明の糸口となる可能性が出てきた。我々はオリゴデンドロサイトでヒト野生型 α -シヌクレインを発現するトランスジェニックマウスを作成し、MSAのモデルマウスとしての可能性を検討した。また、トランスジェニックマウスの小脳脳幹の遺伝子発現をDNAチップ法で解析した。

B. 研究方法

ヒト野生型 α -シヌクレインをマウスミエリン塩基性タンパク質プロモーター制御下でオリゴデンドロサイトに特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。また、DNAチップ (Affymetrix 社 GeneChip U74) を用いて、トランスジェニックマウスとその同腹コントロールマウスの小脳脳幹における遺伝子発現プロファイルの比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

実験中はマウスに苦痛を与えぬように十分配慮した。

C. 研究結果

我々の作成したトランスジェニックマウスでは多くのオリゴデンドロサイトにヒト α -シヌクレインの発現が認められた。電子顕微鏡的にもオリゴデンドロサイトの細胞体内に異常構造物が認められ、ヒト野生型 α -シヌクレインが細胞内で異常な構造をとり細胞内の秩序を乱している可能性が示唆された。この蓄積 α -シヌクレインは、リン酸化 α -シヌクレイン抗体に反応し界面活性剤に不溶であり、ヒトのシヌクレイノパチーと同様の変化を示した。我々のトランスジェニックマウスでは老齡マウスで歩幅の減少、探索行動の消失などの運動障害が認められた。このことから我々の作成したマウスはMSAのモデル動物としての可能性を有していると考えられた。

次にDNAチップを用いて8週齡における遺伝子プロファイルを解析した。8種類で減少、2種類で

増加が示唆された。TaqMan RT-PCR で遺伝子発現変化を解析してみると、mouse melanoma antigen の発現上昇がトランスジェニックマウスで確認できた。88 週齢の DNA チップ解析では4種類の遺伝子で発現の上昇、12種類で発現の現象が示唆された。

D. 考察

マウス melanoma antigen の遺伝子産物は 80kDa で、その mRNA は mouse leukemia virus の env の全長と LTR 部分を含んでいる。この遺伝子はマウスの第9染色体に存在するが、ラット、ヒトゲノムには存在しない。転写産物は B6 系統のマウス由来の培養細胞で発現が認められる。この遺伝子は正常の胎児、幼弱、成熟マウスでは発現していないが、癌化した細胞で発現が増加することが知られている。この遺伝子はラット、マウスゲノムには存在しないので MSA 発症と直接は関係しないと思われる。しかしトランスジェニックマウスでのこの遺伝子の発現上昇はマウス脳内で変化を間接的にこの遺伝子でモニターしている可能性が有る。トランスジーンの挿入部位による影響も含め、今後注意深くその発現変化の機序を検討する予定である。その他の88 週齢のマウスの遺伝子変化に関しては、変化の確認を含め、さらに検討していく予定である。

遺伝子発現変化は病態の特徴を示すことがあるが、本研究の結果ではポリグルタミン病などを比較して、変化が非常に少ないことがわかった。この原因として 1)オリゴデンドロサイトの変化を小脳脳幹全体として検討しているために十分検出し得なかった可能性、2)症状が乏しいことから病変自体も少なく、GeneChip はその変化を検出する感度がなかった可能性、3)本疾患の病態自体に転写への影響が少ないことの可能性が考えられた。

E. 結論

オリゴデンドロサイト特異的にヒト野生型 α -シヌクレインを発現するトランスジェニックマウス

において生化学的・病理学的にシヌクレオパチーと類似の変化を認めたことから、MSA のモデルマウスとなる可能性がある。このマウスで検出された遺伝子発現変化についてはさらに検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kotliarova, S., Jana, N.R., Sakamoto N., Kurosawa, M., Miyazaki, H., Nekooki, M., Doi, H., Machida, Y., Wong, HK., Suzuki, T., Uchikawa, T., Kotliarov Y., Uchida, K., Nagao, Y., Tamaoka, A., Oyanagi, K., Oyama, F. & Nukina, N. Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in transgenic mice with expanded polyQ-EGFP fluorescent aggregates. *J Neurochem* (2005) in press.

Nagaoka, U., Kim, K., Jana, N. R., Doi, H., Maruyama, M., Mitsui, K., Oyama, F. & Nukina, N. Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *J Neurochem* 91, 57-68 (2004).

Oyama, F., Kotliarova, S., Harada, A., Ito, M., Miyazaki, H., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N. & Ihara, Y. Gem GTPase and tau: morphological changes induced by gem GTPase in cho cells are antagonized by tau. *J Biol Chem* 279, 27272-27277 (2004).

Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N. R., Doi, H., Kurosawa, M., Nekooki, M. & Nukina, N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 10, 148-154 (2004).

2. 学会発表

Oyama, F., Kotliarova, S., Harada, A., Ito, M., Miyazaki, H., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N & Ihara, Y. Gem GTPase and tau: morphological changes induced by Gem GTPase in CHO cells are antagonized by tau. *The American Society of Human Genetics 54 Annual Meeting*, Toronto, Canada (October 2004).

小山文隆, 黒沢大, 宮崎晴子, 土井宏, 町田陽子,

WONG Hon kit, 貫名信行. 伸長 polyglutamine-EGFP 蛍光凝集体を形成するハンチントン病トランスジェニックマウス脳における視床下部神経ペプチド類の発現低下 (II-B4). 第23回日本痴呆学会学術集会, 東京 (2004年9月).

長岡詩子, 金健, JANA Nihar Ranjan, 土井宏, 丸山美枝子, 三井健一, 小山文隆, 貫名信行. 伸長ポリグルタミンにより発現増加し封入体に局在する p62 の解析 (II-C5). 第23回日本痴呆学会学術集会, 東京 (2004年9月).

小山文隆, 黒沢大, 宮崎晴子, 土井宏, 町田陽子, 貫名信行. 伸長 polyQ-EGFP 融合タンパク質凝集体を形成するハンチントン病トランスジェニックマウスにおける視床下部神経ペプチドの発現の低下. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経科学学会大会 (Neuro2004), 大阪 (2004年9月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

シヌクレイノパチーにおける細胞死の機序：細胞モデルによる検討

分担研究者：武田 篤（東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野助手）

研究協力者：長谷川隆文¹⁾、小林理子¹⁾、菅野直人¹⁾、糸山泰人¹⁾、菊池昭夫²⁾、古川勝敏³⁾

所 属：¹⁾東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学講座神経内科学分野

²⁾仙台医療センター神経内科

³⁾Laboratory of Neuroscience, National Institute on Aging, NIH, USA

【研究要旨】 MSA を含む synucleinopathy の病態解明のため α -synuclein 過剰発現細胞を作成して変異シヌクレインによる細胞死の機序を検討した。野生型・変異型 α -synuclein の過剰発現により、細胞形態や増殖の程度に差異はなかった。しかしながら、電気生理学的検討から変異シヌクレインにより細胞膜の傷害が生じ、脱分極時のカルシウム流入が増強されることが示された。シヌクレイノパチーの細胞死の機序として細胞膜傷害が重要であることが強く示唆された。

A. 研究目的

α -synuclein は 140 アミノ酸からなる可溶性蛋白で主に細胞質に存在するが、パーキンソン病脳内の Lewy 小体の主要構成蛋白であるのみならず、多系統萎縮症の pathological hallmark である glial cytoplasmic inclusion (GCI) の構成蛋白でもある。これらの疾患群は synucleinopathy と総称されるが、synucleinopathy 病態下の α -synuclein は、ユビキチン化、リン酸化、ニトロ化などの様々な修飾を受け、特有の高次構造をとって凝集していることが知られている。我々は昨年までの本研究班での研究成果として、1) α -synuclein を過剰に発現する神経芽細胞腫由来の細胞株を樹立し、2) シヌクレイノパチー類似の細胞内凝集体を実験的に形成する細胞モデルを確立した。さらに3) 細胞内凝集体形成が細胞死のプロセスを抑制する細胞保護的機能をもつ可能性を示唆する結果を得た。

そこで本年度は、この細胞モデルにおける

細胞死のメカニズムについて更に検討を加えることとした。

B. 研究方法

α -synuclein をヒトリンパ球 cDNA より PCR 法にて増幅しクローン化した。site directed mutagenesis により A30P、A53T 変異を導入したクローンと野生型クローンを作成し、発現ベクター (pCEP4) に組み込んだ。これらを SH-SY5Y 細胞に transfection して得た α -synuclein 過剰発現細胞を、鉄、ROS (reactive oxygen species) donor、NO (nitric oxide) donor などに曝露して細胞質内に α -synuclein 凝集体を生じさせた。凝集体の性状は免疫組織化学的に検討した。蛍光染色の結果は共焦点レーザー顕微鏡により定量的に行った。細胞死のマーカーとしては、MTT assay や活性型 caspase3 の免疫組織化学染色を用いた。さらにパッチクランプ法による電気生理学的手法による分析を加えた。

C. 研究結果

これまでに報告した通り、正常型及び変異型 α -synuclein の過剰発現により細胞増殖や形態に特記すべき変化は認めなかった。そこで、パッチクランプ法を用いて、電気生理学的検討を加えた。静止膜電位を測定したところ、変異型のシヌクレイン発現時には細胞膜のコンダクタンスが上昇し、静止膜電位が浅くなることが確認された。変異型・正常型シヌクレインの細胞内発現量については差異を認めなかった。次に Fura2 蛍光色素により細胞内カルシウム濃度を検討した。変異シヌクレイン発現細胞では脱分極時には、細胞内カルシウム上昇の程度が正常シヌクレインに比較して有意に増強された。キレート剤の添加により、変異シヌクレイン発現細胞の脆弱性は是正された。

D. 考察

変異 α -synuclein の過剰発現により細胞膜傷害が生じていることが示唆された。膜傷害の程度は A53T 変異でより顕著であった。A53T 変異をもつ家族性パーキンソン病の家系は、より若年発症の重篤な表現型を呈することが知られていることと今回の実験結果は矛盾しない。本細胞モデルはシヌクレイノパチーの病態を良く反映していると考えられた。これまでの検討から、細胞内 α -synuclein 凝集体形成は細胞保護的であることが示唆されて来たが、今回の結果は、凝集に至る以前の病的代謝過程が、細胞死の直接の引き金となっていることを強く示唆する。

E. 結論

これまでの検討から α -synuclein による細胞内凝集体形成は細胞保護的であることが示

唆されていたが、今回の実験結果は細胞死の機序について、細胞膜の傷害が重要な役割を担っていることを示唆するものである。今後はこうした膜傷害を生じる実態としてのプロトフィブリルの生成機序を解明していく必要があると考えられる。

本細胞モデルは変性疾患脳内封入体に類似した蛋白凝集体を再現できるのみならず、シヌクレイノパチーにおける神経細胞死の機序を検討する上で有力なツールとなると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuzaki M., Hasegawa T., Takeda A., Kikuchi A., Furukawa K., Kato Y., Itoyama Y., Histochemical features of stress-induced aggregates in α -synuclein overexpressing cells. *Brain Research* 1004: 83-90, 2004.
- 2) Hasegawa T., Matsuzaki M., Takeda A., Kikuchi A., Akita H., Smith MA., Itoyama Y., Accelerated formation of α -synuclein aggregates in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Research* 1013: 51-59, 2004.
- 3) Nunomura A., Chiba S., Lippa C.F., Cras P., Kalaria R.N., Takeda A., Honda K., Smith M.A., Perry G., Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 17: 108-113, 2004.
- 4) Nunomura A., Chiba S., Takeda A., Smith MA., Perry G., Oxidative stress in Alzheimer disease: the earliest cytological and biochemical feature. Takeda M (ed);

- Molecular neurobiology of Alzheimer disease and related disorders*, p164-171, Karger, Basel, 2004.
- 5) Lee HG., Casadesus G., Zhu X., Takeda A., Perry G., Smith MA., Challenging the amyloid cascade hypothesis: senile plaques and amyloid-beta as protective adaptations to Alzheimer disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1019: 1-4, 2004.
 - 6) Takeda A., Itoyama Y., Kimpara T., Zhu X., Avila J., Dwyer BE., Perry G., Smith MA., Heme catabolism and heme oxygenase in neurodegenerative disease. *Antioxidants and Redox Signaling* 6: 888-894, 2004.
 - 7) Lee H-g., Zhu X., Drew KL., Joseph JA., Nunomura A., Hirai K., Takeda A., Perry G., Smith MA., Oxidative adaptation in aging and Alzheimer disease: the roles of amyloid tau. Hiramatsu M. & Yoshikawa T. (ed); *Molecular Interventions in Lifestyle-Related Diseases*, (in press) Packer, Marcel Dekker, New York, 2004.
 - 8) Liu Q., Lee HG., Honda K., Siedlak SL., Harris PL., Cash AD., Zhu X., Avila J., Nunomura A., Takeda A., Smith MA., Perry G., Tau modifiers as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* :1739(2-3):211-5, 2005.
 - 9) Takeda A., Kimpara T., Itoyama Y., Perry G., Smith MA., Roles of heme catabolism in neurodegeneration revised, Abraham NG (ed.); *Heme Oxygenase in Biology and Medicine*. 2nded (in press), Kluwer Academic / Plenum Pub., New York, 2005.
 - 10) 武田篤、長谷川隆文、小林理子、 α シヌクレインと神経病態、Annual Review 神経 2005, p1-11, 中外医学社, 2005
2. 学会発表
- 1) 小林理子、長谷川隆文、武田篤、菊池昭夫、糸山泰人、 α -synuclein 凝集体形成による細胞保護作用、第 45 回日本神経学会総会、東京、2004
 - 2) 武田篤、小林理子、長谷川隆文、菊池昭夫、糸山泰人、チロシン水酸化酵素発現調節モデルを用いたシヌクレイノパチーの病態解析、第 45 回日本神経学会総会、東京、2004
 - 3) 長谷川隆文、小林理子、菊池昭夫、武田篤、チロシナーゼ発現調節モデルを用いたカテコラミン酸化物による神経細胞死の病態解析、第 45 回日本神経学会総会、東京、2004
 - 4) Hasegawa T, Kobayashi M, Takeda A, Kikuchi A, Furukawa K, Itoyama Y. Oxidized catecholamine metabolites by tyrosinase overexpression induces apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 8th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Rome, Italy, 2004.
 - 5) Kobayashi M, Hasegawa T, Takeda A, Kikuchi A, Itoyama Y. Protective role of α -synuclein aggregation induced by iron. 8th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Rome, Italy, 2004.
 - 6) Takeda A, Kobayashi M, Hasegawa T, Kikuchi A, Itoyama Y. Inducible overexpression of tyrosine hydroxylase and dopamine production in cellular model. 8th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Rome, Italy, 2004.

生細胞でのポリグルタミン・オリゴマーの可視化システムの検討

分担研究者 小野寺理 新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター
研究協力者 高橋俊昭¹⁾、菊池信矢¹⁾、西澤正豊²⁾
1) 新潟大学医学部保健学科 2) 新潟大学脳研究所神経内科

研究要旨

近年、ポリグルタミン病での増大ポリグルタミン鎖による凝集体形成は防御的反應で、可溶性オリゴマーが神経細胞障害性を持つという考え方が支持されつつある。このオリゴマーを可視化することが、細胞障害性獲得の時系列を明らかとする上で重要と考え、FRET による可視化システムの確立を目指した。ポリグルタミン鎖に monomeric CFP (以下 mCFP), monomeric YFP (以下 mYFP) を付加したプラスミドを作成し parallel および anti-parallel 条件下で細胞に導入し、共焦点レーザー顕微鏡を用い解析した。その結果、FRET は parallel の組合せのみで起こり、細胞内に一様に観察された。長さ依存性に FRET 陽性細胞の割合の増加と平均 ratio 値の増加を認め、また経時的観察では、これらの dimer は短時間のうちに凝集体へと移行した。これらの結果からポリグルタミンダイマーは parallel 構造をとり長さ依存性に dimer 形成をきたすことを示した。本手法により凝集体形成前の細胞機能障害と、ポリグルタミンの状態の新たな関係が明らかとされる可能性がある。

A. 研究目的

ポリグルタミン病は病因遺伝子翻訳領域内の 35-40 グルタミン伸長を閾値として発症し、細胞内凝集体を認める。凝集体形成と病態との関連が検討されてきたが、近年、この凝集体形成はむしろ防御的な反応であると考えられてきている。対して、可溶性の増大ポリグルタミン鎖がオリゴマーを形成して神経細胞障害性を持つという考え方が提唱されている。しかし、生細胞内で実際に増大ポリグルタミン鎖の凝集体形成前のオリゴマーの状態を示した報告はない。我々は、増大ポリグルタミン鎖によるオリゴマー構造が生細胞内で形成されるかを検討する目的で、増大ポリグルタミン鎖のダイマー～オリゴマー形成を FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 技術を用いて可視化するシステムを確立することを目的とした。

B. 研究方法

ポリグルタミン鎖(Q12, Q36, Q56, Q80)の C

末もしくは N 末に蛍光蛋白(mCFP, mYFP) を付加したコンストラクトを作成し種々の組み合わせで COS7 細胞にて一過性に発現した。48 時間後に共焦点レーザー顕微鏡 (CSU10; 横河電気) 及び蛍光顕微鏡(TE-2000U; Nikon)、W-view, AQUACOSMOS 画像解析システム(浜松ホトニクス)を用い、ratio 画像解析、accepter bleaching 法にて解析を行った。mCFP の励起は iFLEX-200 (405nm; POINT SOURCE 社) にて行った。

(倫理面での配慮)

本研究で対象とするヒト由来試料については、試料、DNA の保存・管理、その後の解析について患者および親族に説明し、研究目的に使用することへの同意を得ている。また個人のプライバシーについても十分に保護された。

C. 研究結果

従来、ポリグルタミン鎖のダイマー形成モデルとして、anti-parallel と parallel の二説が報告されていた。生細胞内での挙動に関して

はいずれも示唆するデータは得られていなかった。今回我々は parallel の組み合わせのみ Q12、Q56 とともに FRET を確認した(図 1)。一方 anti-parallel の組み合わせでは FRET は認めなかった(図 2)。

確認された FRET は細胞内に一様に広がっており、長さ依存性に FRET 陽性細胞の割合 (Q12-9.5%, Q36-24.2%, Q56-27.2%, Q80-36.7%) の増加(図 3)と FRET の平均 ratio 値 (Q12-0.77, Q36-0.82, Q56-0.90, Q80-0.91)の増加を認めた (図 4)。また FRET 陽性細胞群と陰性細胞群では各細胞での ratio 値には不連続部分が存在し、二極化していた (図 4)。

FRET 陽性細胞 (Q56)の経時的観察では、細胞内に ratio 値の急増する spot が出現し、5～10 分の短時間で凝集体を形成した。この際、細胞質の ratio 値は急激に減少した (図 5)。

D.E. 考察と結論

- 1) 生細胞内ではポリグルタミン鎖のダイマー形成は parallel 構造をとることを示した。
- 2) このダイマー形成率はポリグルタミン鎖長による長さ依存性を認めた。
- 3) FRET ratio 値は陰性群と陽性群で不連続であり、ダイマー形成には閾値が存在

して急速に形成する可能性がある。

- 4) 今後、このダイマー形成細胞と転写障害等の細胞障害との関連を明らかにしていく。

G. 研究発表

学会発表『細胞内でのポリグルタミン鎖の可溶性 dimer 形成の可視化』第 27 回日本分子生物学会年会, 2004.12.10. 神戸, 講演要旨集 p999

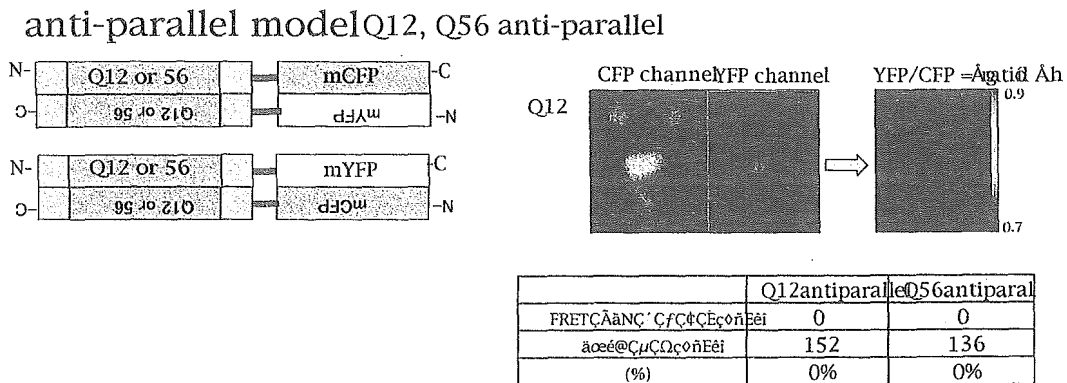
H. 知的財産権の出願・登録状況

現在、出願、登録なし。

(参考文献)

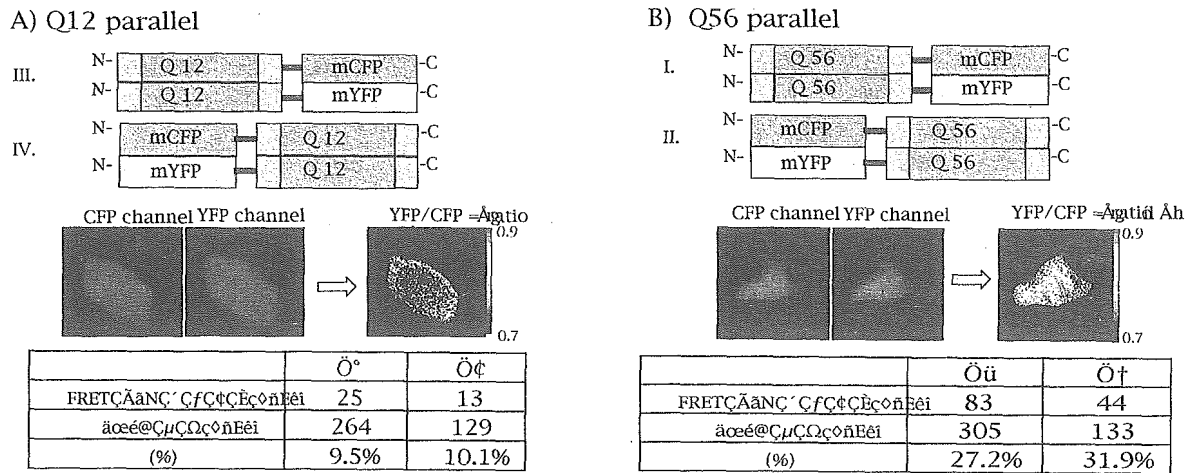
- 1)RY.Tsien et al :Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells.Science 296, 2002.p913-916
- 2)M.Perutz et al :Glutamine repeats as polar zippers:their possible role in inherited neurodegenerative disease.Proc Natl Acad Sci USA 91, 1994. p5355-58
- 3)RH.Lathrop et al. Modeling Protein Homopolymeric Repeats:Possible Polyglutamine Structural Motifs For Huntington's Disease. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol 6. 1998. p105-14.
- 4)AE.Bevivino et al :An expanded glutamine repeat destabilizes native ataxin-3 structures and mediate formation of parallel beta-fibrils. Proc Natl Acad Sci USA 98, 2001. p11955-60

図 1. anti-parallel 仮説を想定してコンストラクトを共発現し FRET 解析を行った。



* anti-parallel 仮説に基づいた共発現では FRET は確認されなかった。

図 2. Parallel 仮説想定してコンストラクトを共発現し FRET 解析を行った。



* parallel model 仮説に基づいた共発現では FRET 陽性の細胞群が確認された。

図 3. グルタミン伸長数と FRET陽性細胞の割合

	Q12parallel	Q36parallel	Q56parallel	Q80parallel
FRETÇÄanc' ÇfÇçÇÈçñEèi	25	73	83	105
äoeé@ÇμÇΩçñEèi	264	302	305	286
(%)	9.5%	24.2%	27.2%	36.7%

図 4. グルタミン伸長数と FRET ratio 値の比較

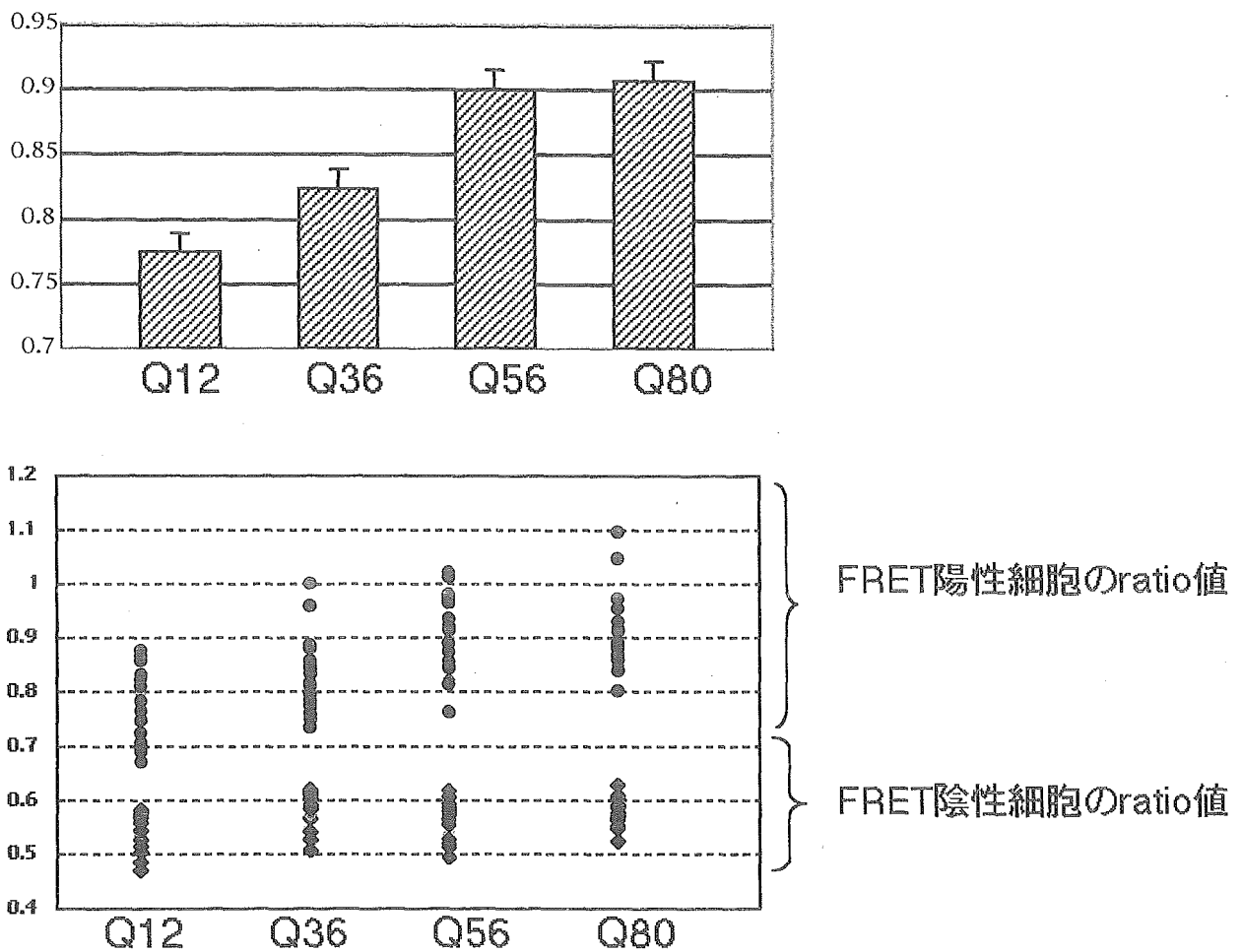
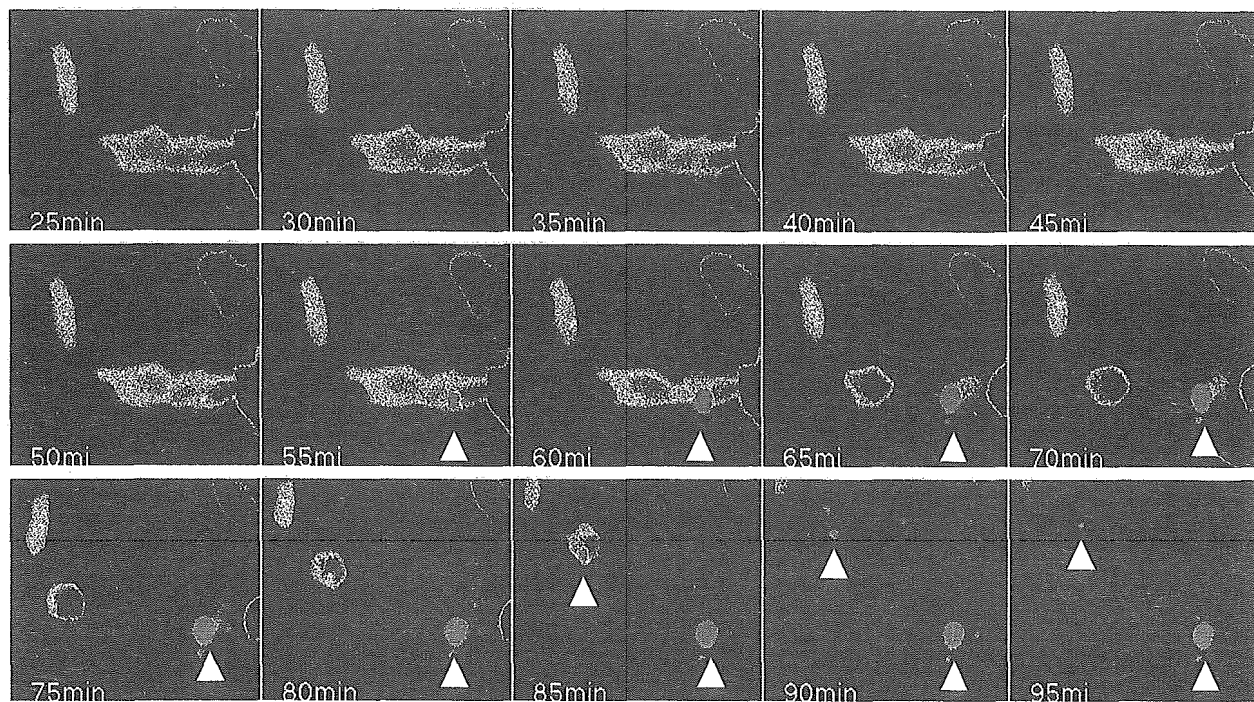


図 5. FRET 陽性細胞の経時変化解析



△は凝集体を示す。

小児大脳型ALDに対するHSCT治療効果（MRIによる評価）

—MRI Loes score による分類から見た、治療効果の検討—

分担研究者 辻 省次 東京大学大学院医学系研究科神経内科学
研究協力者 小野寺理¹⁾、加藤俊一²⁾、加藤剛二³⁾、鈴木康之⁴⁾、藤田直人⁵⁾
宗形光敏⁶⁾、荻野雅弘⁶⁾、大橋十也⁷⁾、衛藤義勝⁷⁾、小田 慈⁸⁾
柳町徳春⁹⁾、加我牧子¹⁰⁾、岡本浩一郎¹¹⁾、橋本 卓¹²⁾、村田博昭¹³⁾

¹⁾新潟大学脳研究所神経内科 ²⁾東海大学医学部小児科 ³⁾名古屋第一赤十字病院小児医療センター血液腫瘍科 ⁴⁾岐阜大学医学部医学教育開発研究センター ⁵⁾広島赤十字原爆病院小児科 ⁶⁾東北大学医学部小児科 ⁷⁾東京慈恵会医科大学小児科/DNA医学研究所遺伝子研究部門 ⁸⁾岡山大学医学部小児科 ⁹⁾東海大学医学部放射線科 ¹⁰⁾国立精神神経センター小児科 ¹¹⁾新潟大学医学部附属病院放射線科 ¹²⁾岸和田徳州会病院小児科 ¹³⁾独立行政法人機構 鈴鹿病院小児科

研究要旨

小児大脳型 ALD(CCALD)に対する造血幹細胞移植(HSCT)の有効性に関して MRI 像による後ろ向き検討を加えた。HSCT 非施行例 4 例と HSCT 施行例 16 例の CCALD 症例の MRI 像を比較した。16 例の HSCT 後 CCALD 症例の MRI 像を主成分分析し、得られた主成分得点よりクラスター分析を行い 4 群に分類した。各群に於る HSCT 後の Loes score の変化を検討し、前頭葉・内包進展群では HSCT 後も Loes score が悪化することを示した。Loes score による HSCT 前の画像所見が、HSCT の治療効果を想定する指標となる可能性を示した。

A. 研究目的

我々は、小児大脳 ALD(CCALD)に対する造血幹細胞移植(HSCT)の有効性に関し、MRI Loes score を用い central review を行い、CCALD 症例では HSCT 後 1.5 年から Loes score の悪化が減少し 2 年以上の例では、ほぼ停止する事を示し、本治療法の有用性につき論じてきた。本年度は①HSCT 未施行例と比較し HSCT の有効性を検討した。②あらたな HSCT 施行例を加え HSCT 施行前の MRI 像をにより、HSCT の治療効果に差異があるか再検討を加えた。

B. 研究方法

HSCT 後 CCALD16 症例、HSCT 未施行例 4 症例につき共同研究施設より、以下の条件に最も近接する MRI 像のコピーフィルムを得 O.O. が Loes 法に基づきスコア化した。

MRI 像は ①診断時 ②HSCT 直前 ③HSCT直後 ④6ヵ月後 ⑤1年後 ⑥2年後 ⑦

最も最近のもの について検討するよう計画した（HSCT 未施行例では②、③は無し）。しかし、後ろ向き研究であるため、撮像時期に関しては上記の条件に最も近接するものを対象とした。症例によっては、それ以上詳細な間隔での MRI 像を検討した。

(倫理面での配慮)

本研究で対象となった患者情報に関しては研究過程及び研究成果発表の段階に於いて厳密に守られた。

C. 研究結果

4 例の HSCT 非施行例と 16 例の HSCT 施行群との間で Loes score の経時的変化を検討した。HSCT を行うまでの時間経過に差があるため、HSCT 施行例では HSCT 施行時を基準（時系列の 0 点）とした。一方 HSCT 非施行例では診断時を基準とし、経時的な Loes score を比較した（図 1）。基準から半年以内の Loes score に大きな変化は認めなかったが、2.5 年以降の Loes score は非

施行群で高値を示した。一方、年あたりの Loes score の変化率は、HSCT 非施行群では、発症後 1.5 年以降も Loes score の悪化を認めた(図 2)。2.5 年以降では両群とも変化が緩慢であった。

HSCT 治療効果に対する HSCT 施行前の MRI 像を検討するため、16 例の HSCT 直前の Loes score を用い、主成分分析を行った。その結果、1) 側頭葉-感覚路 2) 前頭葉-内包前脚 3) 内包後脚 4) 基底核の 4 つの主成分を抽出した(表 1)。これらの主成分から計算された主成分得点を用い、Two step クラスタ分析を行い 1) 基底核型 1 例 2) 内包進展型 4 例 3) 内包非進展型 5 例 4) 軽度 6 例 の 4 群に分類した(表 2)。次に、分類した 4 群のうち 1 例のみであった基底核群をのぞき、HSCT 前後での Loes score の変化を検討した。軽度 内包非進展型では、HSCT 後、Loes score の変化率が低下するのに比して、内包進展型では、半年以降も悪化を示した(図 3)。

D.E. 考察と結果

今回我々は CCALD に対する HSCT の有効性を明らかにするために、HSCT 非施行例と比較検討した。その結果、HSCT 非施行例では、基点から 1.5 年以上 2.5 年未満の Loes score および Loes score の悪化率共に、施行例に比して高値を示した。この結果は CCALD に対する HSCT の有効性を示唆する結果と考える。

今回の解析の問題点として HSCT 非施行例の基点(時系列での 0 点)の設定があげられる。HSCT 非施行例では診断時を基点と設定した。一方 HSCT 施行例では、HSCT による変化を明確にするため HSCT 施行時を基点として解析した。何れも診断時を基点とする方法も考えられたが、HSCT の有効性を判定するには適切な設定ではない。そこで、HSCT 未施行例では、診断時を基点として比較した。そのため、HSCT 非施行例では、施行例より時系列が先であり、より早期である可能性がある。少なくとも、この設定で、HSCT 未施行例に関して、HSCT

施行例に対し、基点設定の違いの影響で、HSCT 未施行例が重症化することはない。

一方、HSCT を見送られたということはその時点で、症状の進行が早く重症であったという可能性があり、この無作為比較ではないため、この影響は避けられないと考える。ただし基点から半年以内の Loes score は近似しており、未施行例が際立って重症であったとは考えられない。以上より、HSCT 施行例の Loes score は HSCT 非施行例に比して、より低値を示したと考えられる。

加えて、今回我々は、昨年度の解析に例数を加え、HSCT 前の Loes score から CCALD を 4 群に分類した。さらに内包進展型で HSCT に対する治療効果が異なる可能性を示した。この群は、HSCT 後も一貫して Loes score の悪化を示す。このことから、HSCT 前の MRI 像を検討することにより、HSCT に対する反応性、本症の high risk 群を予見しうる可能性が示唆された。

今後、より症例を集積し、HSCT 治療効果に影響をあたえる画像変化について知見を得ることが、本症の効率的な治療方法を提案する上で重要と考える。また今回分類した他の 2 群では、HSCT 施行直後から Loes score の悪化が停止した。このことから、術前の MRI 分類で内包進展型以外の症例では、本治療法により症状の安定が期待できる。

今回の結果は CCALD に於ける HSCT の有効性を示唆する結果である。今後、①予後良好例と不良例の HSCT 施行前の MRI 所見の境界領域を明確化する。②造影効果の有無による進行速度の検討を加えることが必要と考えた。

Loes DJ, *et al.* Adrenoleukodystrophy: A Scoring Method for Brain MR Observations. *AJNR* 15:1761-1766, Oct 1994

Shapiro E, *et al.* Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet*. 2001;356;713-8

Loes DJ *et al.* Analysis of MRI patterns of progression in X-linked adrenoleukodystrophy *Neurology* 2003;61;369-37

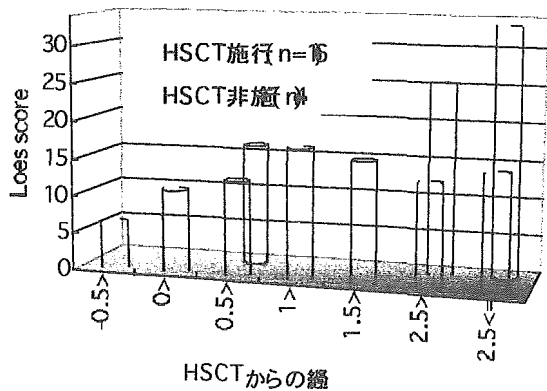


図 1 Loes score 値の変化

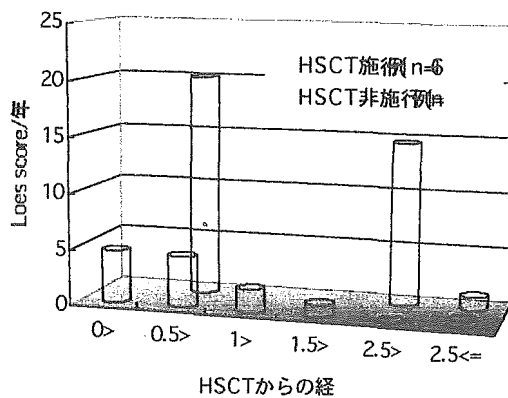


図 2 Loes score の年あたり変化率

	側頭葉-感覚路	前頭葉-内包前脚	内包後脚	基底核
後頭葉白質	0.24	0.03	-0.02	-0.91
側頭葉白質	0.83	0.27	0.06	-0.08
前頭葉白質	-0.39	0.50	0.42	-0.20
後頭葉から前頭葉に進展	0.48	0.11	0.64	-0.18
前頭葉のみに変化	-0.56	0.74	-0.05	-0.26
脳梁膨大部	0.43	0.66	0.06	0.37
脳梁体部 (単独)	-0.32	0.73	-0.37	-0.09
脳梁体部 (膨大部から連続)	0.53	0.12	0.53	-0.05
脳梁膝部	-0.47	0.54	-0.15	-0.06
視放線	0.93	0.29	-0.06	-0.07
マイヤーループ	0.83	0.27	-0.29	-0.07
外側膝状核	0.88	0.21	0.02	-0.08
視索	0.33	0.16	0.16	-0.05
内側膝状核	0.84	0.28	-0.05	0.38
下丘脳	0.75	0.33	0.00	0.48
外側毛帯	0.93	0.29	-0.06	-0.07
台形体	0.77	0.34	-0.24	0.03
内包	-0.27	0.36	0.80	0.28
内包前脚	-0.56	0.74	-0.05	-0.26
内包後脚	0.08	-0.08	0.81	-0.12
錐体路脳幹	-0.79	0.04	0.24	0.27
基底核	-0.27	0.06	-0.11	0.67
視床前部	-0.59	0.52	-0.02	0.48
小脳の萎縮	-0.56	0.74	-0.05	-0.26
脳萎縮	0.32	0.04	0.17	0.01

表 1 Loes score を用いた主成分分析 (各項目の抽出された成分内における主な主成分係数を太字で示した)

Case	側頭葉-感覚路	前頭葉-内包前脚	内包後脚	基底核	
12	-0.89	-0.1	0.09	3.43	基底核
2	-2.11	2.78	-0.17	-0.97	前頭葉-内包
17	0.99	0.74	1.73	-0.31	後頭葉-内包
3	0.99	0.34	1.16	-0.04	後頭葉-内包
1	0.75	0.1	1.74	0	後頭葉-内包
4	0.5	0.95	-1.7	0.53	内包非進展型
8	0.91	0.16	-0.64	0	内包非進展型
11	0.9	0.13	-0.85	0.05	内包非進展型
13	0.73	0.09	-0.91	0.04	内包非進展型
16	0.91	0.16	-0.64	0	内包非進展型
5	-0.56	-0.6	0.64	-0.03	軽度
6	-1.25	-0.48	0.96	0.06	軽度
7	-0.73	-1.26	-0.63	-0.68	軽度
9	-0.73	-1.26	-0.63	-0.68	軽度
10	-0.89	-1.28	0.21	-0.55	軽度
15	0.49	-0.47	-0.37	-0.83	軽度

表 2 各症例の抽出された 4 主成分の主成分得点とクラスター分析による分類（主成分得点が 0.7 以上を太字で示した）

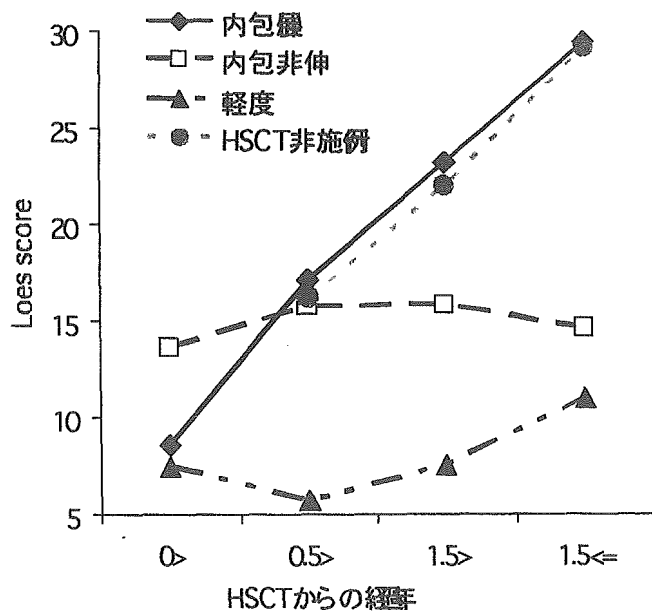


図 3 HSCT 施行前の MRI 所見による分類群と HSCT 非施行例との Loes score の変化

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

副腎白質ジストロフィーおよびペルオキシソーム病の
病態と治療法開発に関する研究

分担研究者 鈴木康之（岐阜大学医学部医学教育開発研究センター）

研究要旨

副腎白質ジストロフィーやペルオキシソーム欠損症は中枢神経に主病変があり、前者は脱髄、後者は神経細胞移動障害が特徴的である。しかし、ペルオキシソームの中枢神経の発生、発達過程に果たす役割はほとんど解明されていない。今年度の研究により、中枢神経の発生発達過程におけるペルオキシソーム膜タンパクならびにマトリックスタンパクの神経細胞内における局在を生後マウス小脳組織と胎生15日の小脳分散培養を用いて明らかにした。その結果、グリア細胞においては膜タンパクならびにマトリックスタンパクともペルオキシソームに局在していたのに対し、プルキンエ細胞においては膜タンパクは存在するもののマトリックスタンパクは局在していなかった。今後、神経幹細胞を用いて分化過程におけるタンパクの局在を明らかにするとともに、中枢神経におけるペルオキシソーム代謝機構を明らかにして、ペルオキシソーム病における中枢神経病変の発症機序を解明したい。

研究協力者

下澤伸行（岐阜大学生命科学総合実験センター）

A. 研究目的

副腎白質ジストロフィーおよびペルオキシソーム欠損症はいずれも細胞内小器官であるペルオキシソームの代謝機能に異常をきたす遺伝性疾患である。ペルオキシソーム欠損症の中枢神経病理所見としては大脳半球や小脳プルキンエ細胞に見られる migration の異常が特徴的であり、またそのモデルマウスでもプルキンエ細胞樹状突起の形態異常が報告されており、中枢神経系の発生におけるペルオキシソームの関与が示唆されているが、その詳細は不明である。本研究では神経系の発生・分化におけるペルオキシソームやペルオキシソームタンパクの細胞内局在を明らかにするために、生後マウス小脳の凍結切片および胎生期マウス小脳の分散培養にて免疫組織化学的にペルオキシソームの細胞内局在を検討したので報告する。

B. 研究方法

（1）生後マウス小脳凍結切片を用いた免疫組織化学的検討

日齢0-21日のICRマウス小脳の凍結切片を作成し、ペルオキシソーム膜タンパクであるPex14pの抗体とマトリックスタンパクであるカタラーゼおよびペルオキシソームβ酸化系酵素に対する抗体、さらに神経細胞の指標としてプルキンエ細胞に対する抗IP3R抗体もしくは抗calbindin抗体、グリア細胞に対する抗vimentin抗体もしくは抗GFAP抗体を用いて二重免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

（2）胎仔マウス小脳の分散培養細胞を用いた免疫組織化学的検討

胎生15日のICRマウス小脳より細胞分散液を作製し、無血清培地にて14日間培養後、固定し、凍結切片と同様の方法にて染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

C. 研究結果

生後小脳組織においても胎仔小脳分散培養細胞レベルにおいても、抗ペルオキシソーム膜タンパク抗体による染色ではグリア細胞、プルキンエ

ンエ細胞双方にペルオキシソームの顆粒状染色が認められた。一方、複数の抗マトリックスタンパク抗体を用いた染色では、グリア細胞では豊富に顆粒状染色が認められたのに対し、プルキンエ細胞では生後凍結切片でも分散培養でも殆ど顆粒状染色物は認められなかった。

D. 考察

以上の結果よりグリア細胞には正常にマトリックスタンパクを有するペルオキシソームが存在しているのに対し、プルキンエ細胞ではペルオキシソームの膜構造自体は存在するもののマトリックスタンパクは局在しておらず、細胞内輸送機能もしくはタンパク自体の産生や分解に異常を来している可能性が考えられた。このことは発達神経系におけるペルオキシソームタンパクの細胞内輸送やペルオキシソーム代謝におけるニューロン・グリア相互作用の関与を解明するための重要な所見であると思われた。現在、神経幹細胞を用いて分化段階における各細胞のペルオキシソーム形成やマトリックスタンパクの細胞内局在の変動について検討中である。

E. 結論

マウス小脳を用いてペルオキシソームタンパクの神経細胞内の局在について明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi M, Hatano N, Yokota S, Shimozawa N, Imanaka T, Taniguchi H. Proteomic analysis of rat liver peroxisome: Presence of peroxisome-specific isozyme of lon protease. *J Biol Chem.* 279: 421-8, 2004
- 1) J Gootjes, O Elpeleg, F Eyskens, H Mandel, D Mitanchez, N Shimozawa, Y Suzuki, HR. Waterham, RJA Wanders. Novel mutations in the PEX2 gene of four unrelated patients with a

peroxisome biogenesis disorder. *Pediatr Res.* 55: 431-6, 2004

- 1) Nagase T, Shimozawa N, Takemoto Y, Suzuki Y, Komori M, Kondo N. Peroxisomal localization in the developing mouse cerebellum: Implications for neuronal abnormalities related to deficiencies in peroxisomes. *Biochim Biophys Acta.* 1671(1-3): 26-33, 2004
- 1) N Shimozawa, T Tsukamoto, T Nagase, Y Takemoto, N Koyama, Y Suzuki, M Komori, T Osumi, G Jeannette, RJA. Wanders, N Kondo. Identification of a New Complementation Group of the Peroxisome Biogenesis Disorders and PEX14 as the Mutated Gene. *Hum Mutat.* 23 (6): 552-8, 2004
- 1) Morita M, Takahashi I, Kanai M, Okafuji F, Iwashima M, Hayashi T, Watanabe S, Hamazaki T, Shimozawa N, Suzuki Y, Furuya H, Yamada T, Imanaka T. Baicalein 5,6,7-trimethyl ether, a flavonoid derivative, stimulates fatty acid beta-oxidation in skin fibroblasts of X-linked adrenoleukodystrophy. *FEBS Lett.* 579(2): 409-14, 2005

2. 学会発表

- 1) N Shimozawa, T Nagase, Y Suzuki, N Kondo: Molecular and neurological findings in Zellweger syndrome. 7th International symposium on neuronal migration disorders and childhood epilepsies, Tokyo, April, 2004
- 1) Shimozawa N, T Nagase, Y Suzuki, N Kondo, RJA Wanders. Molecular analysis of Peroxisome Biogenesis Disorders. 56th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Toronto, Oct, 2004
- 1) Hashimoto K, Kato Z, Nagase T, Shimozawa N, Kuwata K, Omoya K, Li A, Matsukuma E, Yamamoto Y, Ohnishi H, Tochio H, Shirakawa M, Suzuki Y, Wanders RJA, Kondo N. Molecular basis of a temperature-sensitive PEX13 mutation of peroxisomal biogenesis disorder (1): Immunohistochemistry and protein analyses. 56th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Toronto, Oct, 2004
- 1) 長瀬朋子、下澤伸行、竹本靖彦、鈴木康之、近藤直実ニューロンにおけるタンパクのペルオキシソームへの import に関する検討 第46回日本小児神経学会総会、東京、2004
- 1) 長瀬朋子、下澤伸行、船戸道徳、竹本靖彦、鈴木康之、近藤直実. 中枢神経系におけるペ